

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CRISTIANE DA SILVA VIEIRA ALVES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO FÓLICO DURANTE A  
GESTAÇÃO DE RATAS WISTAR EM MEMÓRIA ESPACIAL E  
MARCADORES BIOQUÍMICOS**

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade do Extremo Sul  
Catarinense para obtenção do título  
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra  
Ioppi Zugno.

**CRICIÚMA  
2016**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A474a Alves, Cristiane da Silva Vieira.

Avaliação dos efeitos do ácido fólico durante a gestação de ratas wistar em memória espacial e marcadores bioquímicos / Cristiane da Silva Vieira Alves ; orientadora : Alexandra Ioppi Zugno. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

70 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Ácido fólico – Efeitos colaterais. 2. Homocisteína.  
3. Gravidez. 4. Saúde materna. 5. Estresse oxidativo.  
I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi escrita seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.



Dedico esse trabalho a  
Deus, por nortear meus  
caminhos.



## AGRADECIMENTOS

À Maria Laura e Miguel, meus filhos amados. Filhos, perdão pelos momentos de ausência exigidos para minha formação. Jamais conseguiria expressar em palavras meu amor por vocês.

Ao Wilson, meu marido, pela força que nos une e faz do nosso amor o mais intenso e o maior. Obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

A minha mãe, Terezinha, pela grandeza do seu amor, pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho de mãe que soube me proteger e me ensinar os limites da vida e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas. Amo-a muito e sempre!

A minha sogra, Catarina, você é presença marcante em minha vida. Obrigada por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, me incentivar sempre, por acreditar em mim. Você é exemplo de força-guerreira e renascer constante. Agradeço a você por ter sido minha segunda mãe. Amo-a muito e sempre!

A minha linda e maluca família: irmãos (ãs), cunhados (as), tios (as), sobrinhos (as), primos (as) empreendedores da “Primalhada” (esses são malucos mesmo) ;

À querida professora doutora Alexandra Ioppi Zugno, pelo incentivo e pelo exemplo de competência;

A Lara Canever, que incansavelmente me deu suporte com seus conhecimentos na elaboração desta dissertação;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde UNESC, por partilharem seus conhecimentos.



## RESUMO

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B (vitamina B9), é essencial para o metabolismo de um carbono. Evidências indicam que a ingestão de ácido fólico durante a gravidez e ao longo da vida pode desempenhar um importante papel na modulação da expressão gênica, estresse oxidativo, modular as funções cognitivas e prevenir várias doenças. Apesar da suplementação de ácido fólico ser conhecida por influenciar inúmeras funções fisiológicas, especialmente durante a gravidez, pouco se sabe sobre seus efeitos diretos na saúde materna. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a função cognitiva (memória espacial) e efeitos bioquímicos (dano oxidativo, perfil lipídico e níveis plasmáticos de homocisteína) produzido pela dieta AIN 93 (dieta controle), dieta AIN 93 suplementada com diferentes doses de ácido fólico (5, 10 e 50 mg/kg) e a dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento e, em vários estágios da gestação e lactação de ratas. Nosso estudo demonstrou por meio do teste labirinto em Y (*Y maze*) que as ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico apresentaram déficits significativos na memória espacial, enquanto que os animais suplementados com ácido fólico (5 e 10 mg/kg) não apresentaram déficit de memória. Neste estudo, o grupo controle e as ratas suplementadas receberam o mesmo tipo de ração (dieta AIN 93). A diferença entre estes grupos foi à suplementação com diferentes doses de ácido fólico. Essa diferença pode explicar, ao menos em parte, o fato das ratas do grupo controle e das ratas suplementadas apresentarem um peso superior às ratas da dieta deficiente em ácido fólico durante a última semana de amamentação, independentemente da dose de ácido fólico. Estas ratas também apresentaram um maior consumo de ração durante o acasalamento, gravidez e lactação, quando comparadas aos animais da dieta deficiente em ácido fólico. Houve uma diferença significativa nos níveis de proteínas carboniladas no córtex frontal, hipocampo e estriado, ao comparar os animais da dieta deficiente em ácido fólico às ratas controle e submetidas às dietas suplementadas. Do mesmo modo, uma redução significativa nos níveis de homocisteína foi observada nestas mesmas ratas em relação às ratas da dieta deficiente em ácido fólico. Finalmente, deve-se enfatizar a importância da suplementação de ácido fólico durante a gravidez e lactação, visto que esta vitamina proporciona benefícios significativos não só para a prole, mas para a saúde materna.



Tudo isso por seu considerável efeito protetor contra o dano oxidativo, déficit cognitivo e hiperhomocisteinemia.

**Palavras-chave:** ácido fólico, homocisteína, efeitos cognitivos, dano oxidativo, ratas e gestação.



## ABSTRACT

The folic acid, is a B-complex vitamin (vitamin B9) essential for the metabolism of a carbon. Evidence indicates that intakes of folic acid during pregnancy and throughout life can play an important role in modulating gene expression, oxidative stress, and cognitive functions, and in prevent various diseases. Although folic acid supplementation is known to influence numerous physiological functions, especially during pregnancy, little is known about its direct effects on the mothers' health. Thus, the aim of this study was to evaluate the cognitive (spatial memory) and biochemical effects (oxidative damage, lipid profile and plasma levels of homocysteine) produced by the AIN 93 diet (control), the AIN 93 diet supplemented with different doses of folic acid (5, 10 and 50 mg/kg) and a folic acid deficient diet, during mating, and at various stages of pregnancy and lactation in female rats. Our study demonstrated through the Y maze test, that rats subjected to the folic acid deficient diet showed significant deficits in spatial memory, while animals supplemented with folic acid (5 and 10 mg/kg) showed no deficit in spatial memory. In this study, the control group and folic acid supplemented animals received the same type of feed (the AIN 93 control diet). The difference between these groups was the supplementation with different doses of folic acid. This difference may explain, at least in part, the fact that the control group and the folic acid supplemented rats, presented a higher weight than the female rats in the folic acid deficient group during the last week of breastfeeding, regardless of the dose of folic acid given. These animals also showed a higher feed intake during mating, pregnancy and lactation when compared to the folic acid deficient diet. There was a significant difference in the levels of carbonylated proteins in the frontal cortex, hippocampus and striatum when comparing the animals fed with the deficient diet against animals subjected to the control diet and those in the supplemented group. Similarly, a significant reduction in the levels of homocysteine was observed in the same female rats, compared to the animals which were fed the folic acid deficient diet. Finally, the importance of folic acid supplementation during pregnancy and lactation should be mentioned, as it provides significant benefits not only to the offspring, but also for maternal health. All this is because of the considerable protective effects that this vitamin provides against oxidative damage, cognitive impairment and hyperhomocysteinemia.



**Keywords:** Folic acid, homocysteine, cognitive effects, oxidative damage, female rats and pregnancy.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular do ácido fólico.....	25
<b>Figura 2:</b> Esquema ilustrativo da transferência de moléculas de carbono no metabolismo do ácido fólico.....	27
<b>Figura 3:</b> Desenho experimental.....	40
<b>Figura 4:</b> Desempenho de ratas <i>Wistar</i> submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e amamentação no teste labirinto em Y ( <i>Y maze</i> ).....	44
<b>Figura 5:</b> Número de filhotes nascidos vivos das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e lactação.....	49
<b>Figura 6:</b> Níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e lactação.....	50
<b>Figura 7:</b> Níveis de equivalentes de malondialdeído nas estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, de ratas <i>Wistar</i> submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação.....	51
<b>Figura 8:</b> Níveis proteínas carboniladas nas estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, de ratas <i>Wistar</i> submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação.....	52
<b>Figura 9:</b> Níveis plasmáticos de homocisteína de ratas <i>Wistar</i> submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação.....	53



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.....	38
<b>Tabela 2:</b> Controle de peso das ratas mães durante o período de acasalamento, gestação e amamentação conforme as dietas administradas.....	46
<b>Tabela 3:</b> Peso de ração (g) consumida pelas ratas mães durante o acasalamento, gestação e amamentação.....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-MTHF** – 5-metiltetrahidrofolato  
**5,10-MTHF** – 5,10 metilenotetrahidrofolato  
**ANOVA** – Análise de variância (do inglês *analyses of variance*)  
**BH4** –Tetrahidrobiopterina  
**CBS** – cistationina- $\beta$ -sintetase  
**GCS** – Sistema da clivagem da glicina  
**CGL** – cistationina  $\gamma$  liase  
**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais  
**CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
**DNA** – ácido desoxirribonucléico  
**DNPB** – Dinitrofenilidrazina  
**DPM** – Desvio padrão da média  
**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EPM** – Erro padrão da média  
**ER** – Espécie(s) reativa(s)  
**ERO** – Espécie(s) reativa(s) de oxigênio  
**ERN** – Espécie(s) reativa(s) de nitrogênio  
**HPA** – Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal  
**MDA** – Malondialdeído  
**MS** – Metionina sintase  
**MTHFR** – Metilenotetrahidrofolato redutase  
**NMDA** – N-metil-D-aspartato  
**PUFAs** – Ácidos graxos polinsaturados  
**RL** – Radical(is) livre(s)  
**RNA** – ácido ribonucléico  
**SAH** – S-adenosil homocisteína  
**SAH-hidrolase** – S-adenosil homocisteína hidrolase  
**SAM** – S-adenosil metionina  
**SHMT** – Serina hidroximetiltransferase.  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**SPSS** – (do inglês *Statistical Package for the Social Science*)  
**Vitamina B6** – Piridoxina  
**Vitamina B9** – Ácido fólico  
**Vitamina B12** – Cobalamina  
**TBARS** – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**THF** – Tetrahidrofolato  
**V.O.** – Via Oral  
**VLEC** – Volume de líquido extracelular materno



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1.1 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E METABOLISMO DE UM CARBONO (1C).....	25
1.2 SAÚDE MATERNA, ÁCIDO FÓLICO E COGNIÇÃO .....	29
1.3 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
3.1 RATAS WISTAR DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.....	37
3.2 COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES (DIETAS) ESPECIAIS OFERECIDAS ÀS RATAS WISTAR.....	38
3.3. SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS WISTAR DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO .....	38
3.4 CONSUMO DE RAÇÃO E CONTROLE DE PESO GESTACIONAL DAS RATAS WISTARS .....	39
3.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	41
<b>3.5.1 Labirinto em Y (Y maze) .....</b>	<b>41</b>
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	41
<b>3.6.1 Preparo das amostras.....</b>	<b>41</b>
3.6.1.1 Coleta de sangue .....	41
3.6.1.2 Preparo das amostras cerebrais .....	42
<b>3.6.2 Níveis plasmáticos de homocisteína .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6.3 Perfil lipídico.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6.4 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo.....</b>	<b>42</b>
3.6.4.1 Peroxidação lipídica .....	42
3.6.4.2 Carbonilação de proteínas .....	42
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>70</b>

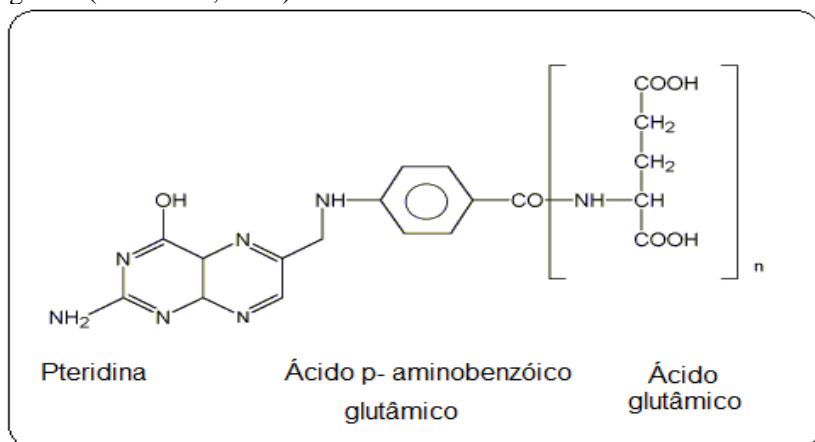


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E METABOLISMO DE UM CARBONO (1C)

O ácido fólico (vitamina B9) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, que atua como cofator de enzimas que participam das transferências de carbono (radicais metílicos) (Ho et al., 2013). Esta vitamina não pode ser sintetizada por mamíferos sendo, portanto, considerada um nutriente essencial, devendo ser ingerida através dos alimentos ou suplementos. As principais fontes alimentares são: vegetais folhosos verdes escuros (espinafre, couve, brócolis); vísceras (fígado e rim); leguminosas e algumas frutas secas (McNulty, 1995). Além destas, diversos produtos comerciais são suplementados com esta vitamina, especialmente as farinhas (Finglas et al., 2003). Vale ressaltar que a quantidade de ácido fólico absorvida varia conforme o indivíduo, dependendo da biodisponibilidade da vitamina ingerida, da taxa de perda pela urina, fezes e catabolismo, podendo ainda ser influenciada por condições patológicas como a má absorção, ou fisiológicas, como gravidez, lactação e crescimento (Wagner, 1995).

O ácido fólico, também denominado ácido pteroilglutâmico, é a forma estável da vitamina B9 (Djukic, 2007). Sua fórmula estrutural ( $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ) é conjugada em um grupo pteridina, um grupo ácido p-aminobenzóico e uma cadeia de ácido glutâmico, conforme descrito na Figura 1 (Cozzolino, 2006).



**Figura 1:** Estrutura molecular do ácido fólico.

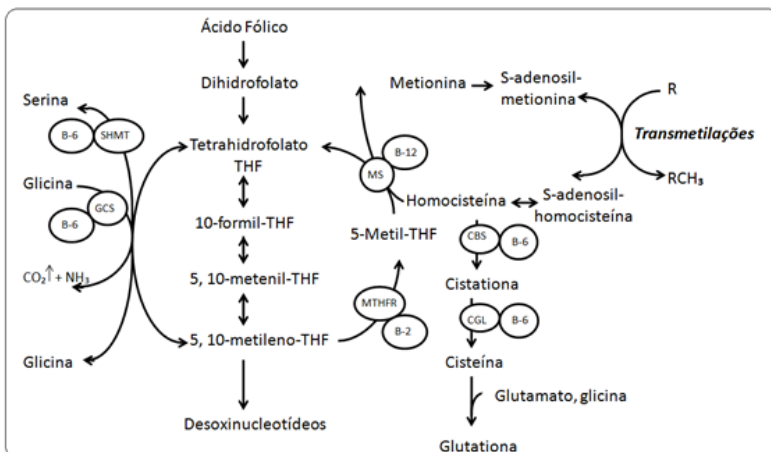
Fonte: Adaptado de Cozzolino, 2006.

O nome folato surgiu do Latim (*folium*), que significa folha, pois foi isolado pela primeira vez a partir de folhas verdes, como o espinafre (Melo, 2004). Geralmente os termos "folato" e "ácido fólico" são usados como sinônimos, no entanto, o folato é a forma obtida da dieta e o ácido fólico é a forma sintética utilizada na fortificação de alimentos e/ou suplementos nutricionais (Djukic, 2007; Miller, 2008). Além disso, no organismo o ácido fólico é altamente absorvido (85-95%) enquanto que com o folato a absorção ocorre em menor grau (50%) (Miller et al., 2009).

A importância do ácido fólico foi observada pela primeira vez por Lucy Wills, em 1931 quando essa constatou que a anemia de trabalhadoras grávidas de Bombaim (Índia) era curada alimentando as doentes com extratos de leveduras e de fígado. No final da década de 1930 o ácido fólico e seus derivados foram identificados como os agentes ativos na dieta de Wills. O ácido fólico foi isolado do espinafre em 1941 e sintetizado na forma pura cristalina por Bob Stokstad em 1943 (McNulty, 1995; Melo, 2004).

O folato refere-se a vários compostos relacionados ao ácido fólico, incluindo o tetrahydrofolato (THF). Já o ácido pteroilglutâmico é encontrado em produtos farmacêuticos e na fortificação de alimentos, embora não seja a forma natural que ocorra nos alimentos e no organismo. A forma bioativa do ácido fólico é o THF, o qual desempenha um papel importante na transferência de um carbono ou grupos metil (também chamados metila - CH<sub>3</sub>), doando-os durante várias reações bioquímicas, inclusive para a biossíntese do DNA (WHO, 2004). Após entrar na célula, o ácido fólico é convertido em dihydrofolato e posteriormente a THF (Melo, 2004). Em seguida, o THF pode ser convertido a 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-MTHF), o qual é importante para síntese de nucleotídeos.

A enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), por sua vez, catalisa a conversão de 5,10-MTHF em 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), forma predominante na circulação e nos tecidos (Mattson e Shea, 2003; Miller, 2008). A 5-MTHF em conjunto com a vitamina B12 (cobalamina), atua como doador de grupos metil na conversão da homocisteína, um aminoácido citotóxico em concentrações elevadas, em metionina, em reação catalisada pela metionina sintase (MS). A metionina por sua vez, é metabolizada em S-adenosil metionina (SAM), principal doador universal de grupos metil em todas as células e na maioria das reações de metilação como: síntese de creatina, fosfatidilcolina, mielina, metilação do DNA e de neurotransmissores (Bottiglieri, 2005; Larsson et al., 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Esquema ilustrativo da transferência de moléculas de carbono no metabolismo do ácido fólico. O THF é convertido em 5,10-MTHF, e em seguida, reduzido a 5-MTHF pela ação da enzima MTHFR, transferindo um grupo metil para a formação da metionina, etapa catalisada pela enzima MS. A homocisteína é metilada a metionina, um aminoácido importante para a síntese de SAM, principal agente nas reações de transmetilações. Dessa forma, alterações na taxa de SAM e SAH podem resultar na diminuição da atividade de metiltransferases como, por exemplo, as DNMTs uma vez que a SAH atua como um potente inibidor das reações de transmetilação dependentes de SAM. CBS: cistationina- $\beta$ -sintetase; CGL: cistationina  $\gamma$  liase; GCS: Sistema da clivagem da glicina; MS: metionina sintase; MTHFR: 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase; R: compostos que recebem grupos metilas; RCH<sub>3</sub>: composto metilado; SHMT: serina hidroximetiltransferase. Fonte: Adaptado de Lamers, 2011.

A homocisteína é um aminoácido sulfurado produzido exclusivamente no ciclo de metilação. Sabe-se que a regulação dos níveis deste aminoácido depende das concentrações de ácido fólico, uma vez que na presença desta vitamina, a homocisteína é rapidamente remetilada à metionina. No entanto, quando os níveis de homocisteína intracelular aumentam, a S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAH-hidrolase) produz excessivamente S-adenosil-homocisteína (SAH), aumentando seus níveis intracelulares e, assim, inibindo a SAM. Desse modo, a SAH atua como um potente inibidor das reações de metilação dependentes de SAM, uma vez que alterações na taxa de SAM e SAH podem resultar na diminuição da atividade de metiltransferases, com

implicações nas reações de metilação envolvendo o ácido desoxirribonucléico (DNA), proteínas, fosfolipídios e neurotransmissores (Bottiglieri, 2005).

Além disso, a homocisteína também pode ser catabolizada pela via de transulfuração. Este aminoácido pode ser convertido em cistationina pela enzima cistationina- $\beta$ -sintase (CBS) e em cisteína pela enzima  $\gamma$ -cistationase, ambas na presença da vitamina B6 (piridoxina) (Figura 2). Esta via resulta no aumento dos níveis de glutatona, o principal antioxidante intracelular, possivelmente devido a um mecanismo compensatório que neutraliza os potenciais efeitos oxidativos da homocisteína em condições normais (Mattson e Shea, 2003).

Níveis elevados de homocisteína e diminuição da glutatona têm sido implicados na Doença de Alzheimer e Parkinson podendo apontar para uma interrupção da via de transulfuração como um possível fator subjacente em doenças neuropsiquiátricas (Bharath et al., 2002; Isobe et al., 2005). Este efeito poder ser reforçado pela elevação da homocisteína em virtude da deficiência de vitaminas B6, B9 e B12 (Mattson e Shea, 2003).

É sabido que as reações de metilação proporcionadas pelo ácido fólico são relevantes para processos como regulação gênica, produção de neurotransmissores e ação de hormônios (Parletta et al., 2013). Esta vitamina aumenta a biossíntese de tetrahidrobiopterina (BH4), a qual é coenzima das enzimas hidroxilases, fundamentais para a síntese de monoaminas e serotonina (Stahl, 2007). Ainda exerce um papel neuroprotetor em danos ao sistema nervoso central (SNC), por promover reparo e crescimento neuronal (Iskandar et al., 2004; Budni et al., 2011). Assim, o metabolismo de um carbono é dependente do equilíbrio nutricional, influenciando a atividade sináptica, além de impactar na regulação da expressão gênica (Mattson e Shea, 2003). Estas características conferem ao ciclo de um carbono uma importante posição ao integrar mudanças ambientais, desenvolvimento do indivíduo e plasticidade neuronal (Bottiglieri et al., 2005). Considerando-se as inúmeras funções do ácido fólico, qualquer anormalidade que ocorra no metabolismo desta vitamina pode afetar o SNC (Miller, 2008; Krebs et al., 2009). Ademais, estudos apontam que o ácido fólico apresenta propriedades antioxidantes, indicando que esta vitamina pode atuar sobre os mecanismos oxidativos envolvidos nestas e em outras doenças (Sarna et al., 2012; Zhao et al., 2014).

Neste sentido, é de extrema relevância estudar os efeitos da deficiência, bem como da suplementação de ácido fólico em diferentes

doses durante a fase gestacional, uma vez que há um aumento na necessidade desta vitamina na gravidez e a sua deficiência ou altas doses podem comprometer a saúde materna, devido ao importante papel do ácido fólico na função cognitiva, humor, dano oxidativo e alteração nos níveis de homocisteína, em especial no período da gestação.

## 1.2 SAÚDE MATERNA, ÁCIDO FÓLICO E COGNIÇÃO

Em países de baixa e média renda, muitas mulheres apresentam dietas pobres e deficientes em macro e micronutrientes essenciais para uma boa saúde. As vitaminas e minerais são os micronutrientes necessários pelo organismo em pequenas quantidades, porém fundamentais, para o funcionamento, crescimento e desenvolvimento normal (Haider e Bhutta, 2012). A gravidez representa um estado de maior requisito metabólico e a ingestão de micronutrientes nesta fase geralmente é inadequada. Durante a gestação, muitas mulheres tornam-se susceptíveis à deficiência de ácido fólico, devido à necessidade de fornecer um aporte nutricional adequado para o bebê, o que pode impactar sobre a sua saúde e a do próprio feto. Adicionalmente, a fase gestacional, pode agravar ainda mais a deficiência nutricional materna muitas vezes pré-existente, comprometendo de fato a saúde da mulher (Haider et al., 2011).

Sabe-se que a deficiência de ferro ou ácido fólico contribui para uma das maiores prevalências de deficiência nutricional entre as mulheres grávidas. A anemia afeta aproximadamente 41,8% das gestações globalmente, sendo a deficiência de ferro, responsável por metade dos casos (Christian et al., 2005). A deficiência de ácido fólico leva à anemia megaloblástica, sendo essa, a segunda causa mais comum de anemia durante a gravidez (Sifakis e Pharmakides, 2000). O ácido fólico tem um papel importante na síntese e manutenção do DNA e, por conseguinte, tem uma maior exigência de suporte ao longo da gestação, sendo primordial para a saúde da mãe e para o crescimento e desenvolvimento normal do feto, bem como para a devida expansão do volume sanguíneo e crescimento dos tecidos maternos nesta fase (Stamm e Houghton, 2013). Dessa forma, estudo demonstra um maior risco de mortalidade materna em gestantes com anemia grave, predispondo à morte por hemorragia e infecções. Ademais, a anemia pode levar a sérias complicações, tais como parto prematuro, baixo peso ao nascer e mortalidade peri e neonatal, gerando um risco tanto para a mãe como para o feto (Christian et al., 2005).

Historicamente, uma deficiência grave de vitaminas do complexo B foi associada a manifestações clínicas profundas, tais como beribéri e anemia, além de alterações neurológicas ou prejuízo no funcionamento cerebral. Sabe-se, no entanto, que muitos problemas nutricionais de saúde pública em algumas partes do mundo têm diminuído, pelo fato das vitaminas do complexo B estar amplamente distribuídas em vários alimentos (cereais integrais, leguminosas, batata, banana, pimenta, nozes e produtos de origem animal). Por outro lado, embora presente em diferentes alimentos, o ácido fólico pode ser facilmente perdido durante a colheita, armazenamento, distribuição, refinamento de grãos e no cozimento dos alimentos fonte. Assim, a sua baixa biodisponibilidade na alimentação, combinada ao seu papel na saúde da mulher, crescimento fetal, desenvolvimento do SNC e prevenção de defeitos do tubo neural, além de outras doenças, levou a fortificação de folato em alimentos industrializados e, então, desde a segunda metade do século passado, a deficiência subclínica de vitaminas B6, B9 e B12 tem sido investigada como causa para problemas de saúde física e mental (WHO, 2004).

Dessa forma, considerável interesse tem se dado ao papel das vitaminas do complexo B, em especial B6, B9 e B12, nos processos cognitivos e funções cerebrais, uma vez que estas vitaminas influenciam os níveis de homocisteína em todo o corpo (Parletta et al., 2013). É sabido que durante a gestação mudanças na concentração e memória são comumente relatadas pelas mulheres, em especial, durante o segundo ou terceiro trimestre de gravidez, refletindo em dificuldade principalmente na memória de trabalho (Hampson et al., 2015). Essas alterações cognitivas podem ser explicadas pelas alterações nos níveis hormonais (Buckwalter et al., 2001), por alterações de humor (Evans et al., 2001) e pelo próprio estado psicológico de adaptação da mulher para uma mudança de vida maior, o que pode interferir no processamento cognitivo normal (Crawley et al., 2003). Ressalta-se ainda que as concentrações de estradiol, estriol, progesterona e outros hormônios atingem valores máximos durante o terceiro trimestre de gestação e, como estes esteróides atuam diretamente em vias envolvidas nos processos neuroquímicos cognitivos, podem influenciar a memória (Hampson et al., 2015). Considerando tais achados, Prado e colaboradores (2012) apontam que suplementação de micronutrientes isolados ou combinados, destacando-se as vitaminas do complexo B, podem melhorar a cognição materna e o humor, uma vez que estes micronutrientes são essenciais para a função cerebral.

Neste sentido, estudos demonstram que os níveis de ácido fólico e homocisteína podem afetar diretamente processos fundamentais de

neuroplasticidade desenvolvimental e adulta, incluindo a proliferação e diferenciação celular em neurônios e células gliais, bem como a sobrevivência neuronal (Mattson e Shea, 2003). Desse modo, a plasticidade sináptica pode ser sensível à homocisteína, uma vez que esta é capaz de alterar a plasticidade e promover a degeneração neuronal, contribuindo de fato para a patogênese de transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas (Parletta et al., 2013).

Assim, níveis adequados de ácido fólico são cruciais para o bom funcionamento corporal e do cérebro (Mischoulon e Raab, 2007). Pesquisas têm indicado o envolvimento da deficiência de vitaminas do complexo B, especialmente do ácido fólico, sobre os distúrbios cognitivos (Bryan, 1998; Selhub et al., 2000; Calvaresi e Bryan 2001). Essas vitaminas são de particular interesse devido à deficiência subclínica leve a moderada na população em geral, principalmente em mulheres na idade fértil (Tolmunen et al., 2003; Casper, 2004). Desta forma, estudos sugerem alguns mecanismos neuroquímicos interligados pelo ácido fólico, vitaminas B12 e B6, uma vez que estas atuam como cofatores em muitas reações bioquímicas, inclusive na síntese de monoaminas, podendo influenciar o desempenho cognitivo e humor (Calvaresi e Bryan 2001; Hannon-Fletcher et al., 2004).

Adicionalmente, é sabido que a nutrição materna exerce um papel determinante na prevenção de diversas doenças (cardiovasculares, psiquiátricas e neurodegenerativas) tanto na mãe como na prole, além de contribuir positivamente para o desenvolvimento cerebral de ambos (Peleg-Raibstein et al., 2012; Van Abeelen et al., 2012). Estudos corroboram informações acima em que os micronutrientes maternos, especialmente os que participam do metabolismo de 1C podem influenciar na susceptibilidade de doenças (Yajnik e Deshmukh, 2012).

Ademais, deficiências graves de ácido fólico ou vitamina B12 durante a gestação causam anemia megaloblástica, acompanhada de diversas manifestações neurológicas maternas ou no bebê (Baumgartner, 2013). Além disso, a deficiência de ácido fólico nesta fase, especialmente entre 21º e 27º dia pós-concepção, aumenta consideravelmente o risco de malformações graves, como os defeitos do tubo neural (espinha bífida e anencefalia). Também está bem descrito, que crianças concebidas num curto intervalo entre as gestações, podem apresentar deficiência nos níveis de ácido fólico. A influência do intervalo entre as gestações poderia ser explicada pela depleção da reserva materna de ácido fólico, quando o estoque desta vitamina ainda está sendo recuperado pela mãe (Dogan et al., 2009). Tomados em conjunto estes achados suportam a hipótese de que a deficiência de

ácido fólico durante a gestação pode ser um importante fator de risco para diversas doenças, em especial neuronais, comprometendo tanto a saúde materna como do feto (Gunawardana et al., 2011) e ainda justificam a suplementação obrigatória de ácido fólico no período periconcepcional e o enriquecimento desta vitamina em alimentos industrializados (farinhas de trigo e milho), no Brasil desde 2004, uma vez que a melhor forma de prevenção é a ingestão adequada desta vitamina (Marchioni et al., 2013).

Considerando-se o importante papel do ácido fólico em processos celulares, a dose adequada e o tempo bem estabelecido para a suplementação desta vitamina pré-concepcional, periconcepcional, na fase de amamentação e também durante a vida, pode ser fundamental para o bom desempenho cerebral e da saúde em geral (Barua et al., 2014). Neste contexto, novos estudos devem decifrar a relação entre a suplementação desta vitamina e o desenvolvimento normal de suas funções, a fim de compreender melhor os possíveis benefícios do ácido fólico, em especial na gestação. Diante disso, o presente estudo utilizou ratas *Wistar* durante a fase gestacional e lactacional e optou pelo uso da ração ANI 93. A formulação da dieta AIN 93 foi descrita por Reeves e colaboradores em 1993, através do Instituto Americano de Nutrição para roedores, que publicou o estudo que relatava a composição nutricional da dieta AIN 93. Assim, a ração experimental AIN 93 foi elaborada devido à necessidade de se ter uma ração equilibrada em macro e micronutrientes para roedores na fase gestacional e lactacional, garantindo assim, um aporte adequado de todos os nutrientes essenciais à saúde das ratas nestas fases, bem como para a prole em desenvolvimento.

### 1.3 ÁCIDO FÓLICO, HOMOCISTEÍNA E ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é necessário para diversas atividades metabólicas corporais que sustentam a vida. Em contrapartida, tanto esses processos endógenos, como fatores exógenos (exposição a poluentes, fumo, drogas, pesticidas e radiação) produzem radicais livres (RL), espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN). Estas moléculas são altamente tóxicas e podem causar danos a lipídeos, proteínas, DNA, ácido ribonucleico (RNA), alterar as funções celulares e, inclusive, causar morte celular, contribuindo então, para uma gama de doenças crônico-degenerativas (doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento precoce) (Rao et al., 2011).

Desta forma, o estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção ERO ou ERN e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (Halliwell, 2006). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, principalmente devido ao seu alto consumo de oxigênio, extensivo uso de glutamato como neurotransmissor, pelo seu elevado conteúdo lipídico, em particular de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), por ser metabolicamente ativo com seu modesto mecanismo de defesa antioxidante e pela presença de células microgliais, as quais podem produzir espécies reativas (ER). Desse modo, Halliwell e Gutteridge (2007) sugerem o envolvimento do estresse oxidativo em processos inflamatórios, prejuízo cognitivo, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Tanto fatores genéticos como ambientais podem ocasionar o aumento celular de ER e influenciar a capacidade de defesa antioxidante, desencadeando dano celular oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA, afetando então, o crescimento e a diferenciação neuronal (Pandya et al., 2013).

A peroxidação lipídica é definida como uma deterioração oxidativa de lipídeos polinsaturados, visto que estes, devido as suas múltiplas duplas ligações, são excelentes alvos para o ataque de RL (Halliwell e Gutteridge, 1999). Tanto as membranas celulares quanto as organelas, contêm grandes quantidades destes ácidos graxos, por isso tendem a sofrer oxidação. Este ataque acarreta modificação em suas propriedades, como alteração na estrutura e na permeabilidade, podendo ocorrer perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Mursu et al., 2004).

A detecção de grupos carbonila está sendo muito utilizada como um indicador de dano oxidativo em proteínas (Urso e Clarkson, 2003). O aumento de proteínas carboniladas está associado a numerosos distúrbios patológicos (Zwart et al., 1999). As ERO podem reagir diretamente com as proteínas ou com moléculas como açúcares e lipídios, gerando subprodutos que reagem com as proteínas (Dalle-Donne et al., 2006). Ao serem atacadas, as proteínas sofrem danos na estrutura e, conseqüentemente, em seu estado conformacional, perdendo a sua função biológica. A oxidação também pode acarretar na degradação da proteína em peptídeos e, eventualmente, em seus respectivos aminoácidos (Aldred e Griffiths, 2004). Além disso, o dano em enzimas reparadoras do DNA pode elevar os níveis de dano oxidativo no DNA, aumentando a frequência de mutações (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Ademais, Roy e colegas (2012) sugeriram que o desequilíbrio de micronutrientes também aumenta o estresse oxidativo devido à geração de RL que interagem com ácidos graxos de membranas ou lipoproteínas. Estas espécies atacam as duplas ligações dos PUFAs e iniciam reações formando peróxido de lipídios. Alterações na ingestão ou metabolismo do ácido fólico e vitamina B12 podem induzir o estresse oxidativo pelo aumento de malondialdeído (MDA) (Roy et al., 2012). Também, a hiperhomocisteinemia induz estresse oxidativo através da ativação de receptores glutamatérgicos, gerando ER, ou pela autooxidação da homocisteína e outros dissulfetos liberando oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). De modo geral, as vitaminas do complexo B podem exercer um efeito neuroprotetor através da modulação do estresse oxidativo induzido pela homocisteína no cérebro (Boldyrev e Jonhson, 2007). Em adição, a deficiência de ácido fólico e vitamina B12 durante a gestação é capaz de induzir o estresse oxidativo materno e na prole, levando a diminuição dos níveis de PUFAs cerebrais, em especial, na prole ao nascer e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de doenças, em especial, na vida tardia. Sabe-se, então, que o estresse oxidativo pode estar presente em qualquer momento da vida, inclusive em períodos mais críticos como na gestação (Roy et al., 2012).

Tomados em conjunto, as informações acima indicam que o uso de micronutrientes maternos, em particular o ácido fólico, pode ser eficaz tanto na prevenção do estresse oxidativo como nas alterações cognitivas, além de proteger contra doenças neuropsiquiátricas e crônico-degenerativas (Pandya et al., 2013). Tudo isso justifica o desenvolvimento desta pesquisa utilizando diferentes doses de ácido fólico durante a fase gestacional como uma abordagem profilática, particularmente, para a manutenção da saúde materna, já que parte dos trabalhos a relacionam o ácido fólico na gestação e a saúde da prole.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito cognitivo e bioquímico da dieta AIN 93 (controle), da dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e da dieta deficiente em ácido fólico durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar semanalmente o ganho de peso de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;
- Monitorar, duas vezes na semana, o consumo de ração de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;
- Comparar o número de filhotes nascidos vivos de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;
- Avaliar o comprometimento cognitivo (memória espacial) de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;
- Avaliar os níveis plasmáticos de homocisteína de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;
- Avaliar o perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93, à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta

deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*;

- Avaliar o dano lipídico (níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) e dano proteico (níveis de carbonilação de proteínas) nas estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratas *Wistar*, submetidas à dieta AIN 93 (controle), à dieta AIN 93 suplementada com ácido fólico em diferentes doses (5, 10 e 50mg/kg) e à dieta deficiente em ácido fólico, durante o acasalamento, a fase de gestação e lactação em ratas *Wistar*.

### 3. METODOLOGIA

Este estudo caracteriza-se como experimental, utilizando um modelo animal. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 100-2014-01 (Anexo). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas adultos com aproximadamente 60 dias de vida, pesando em média 250 g a 300 g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação específica, água disponível e temperatura controlada entre  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ .

#### 3.1 RATAS WISTAR DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Este estudo utilizou um total de 60 ratas *Wistar* adultas virgem que foram mantidas cada uma com um rato *Wistar* macho adulto para acasalamento durante sete dias. A partir do primeiro dia de contato com o macho, as ratas foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos ( $n=12$ ), onde começaram a receber dois tipos de dieta (ração) especial: dieta AIN 93, também denominada dieta controle, e dieta deficiente em ácido fólico. As fêmeas que receberam a dieta AIN 93 ainda foram subdivididas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com ácido fólico nas doses de 5, 10 e 50mg/kg, totalizando assim, os cinco grupos experimentais maternos (Tabela 1).

Após o acasalamento, as ratas permaneceram isoladas uma por caixa e continuaram recebendo a dieta previamente determinada durante todo período gestacional (21 a 28 dias) e lactacional (21 dias). Utilizou-se um número significativo de fêmeas pelo fato de que o estresse gerado pela oferta de uma nova dieta durante todo período do estudo, associado à manipulação dos animais, e ao próprio período gestacional, serem capazes de provocar canibalismo por parte das mães logo após o nascimento dos filhotes (Desantis e Schmaltz, 1984). Ressalta-se que as ratas que não engravidaram foram desconsideradas deste estudo após 21 a 28 dias de acompanhamento.

**Tabela 1:** Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.

<b>GRUPOS</b>
1. Dieta AIN 93 ou <b>controle</b>
2. Dieta deficiente em ácido fólico (AF)
3. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 5mg/kg (AF 5mg/kg)
4. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 10mg/kg (AF 10mg/kg)
5. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 50mg/kg (AF 50mg/kg)

Fonte: Dados da pesquisadora, 2015.

### 3.2 COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES (DIETAS) ESPECIAIS OFERECIDAS ÀS RATAS WISTAR

Neste estudo, utilizaram-se dois tipos de ração (dieta) especial: dieta AIN 93 (controle) e dieta deficiente em ácido fólico. Estas rações foram confeccionadas e fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências ([www.pragsolucoes.com.br](http://www.pragsolucoes.com.br)). Salienta-se que estas rações foram oferecidas as ratas dos grupos experimentais maternos, durante o acasalamento e toda fase de gestação e lactação.

### 3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO PARA AS RATAS WISTAR DURANTE A FASE DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

As ratas *Wistar* que receberam a dieta AIN 93 foram subdivididas em três grupos, conforme já demonstrado na Tabela 1, para suplementação com ácido fólico. Esta vitamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), suplementada nas doses de 5, 10 e 50mg/kg, foi preparada antes da administração sendo solubilizada em água em um volume de 1ml/100g e administrada por via oral (v.o.) uma vez ao dia, durante toda a fase de acasalamento, gestação e lactação. As doses de suplementação foram administradas conforme respectivo peso de cada rata, no volume de 1ml/kg. As doses de ácido fólico foram escolhidas com base em estudos anteriores realizados por Brocardo et al. (2008a); Brocardo et al. (2008b); Brocardo et al. (2009) e Budni et al. (2012).

### 3.4 CONSUMO DE RAÇÃO E CONTROLE DE PESO GESTACIONAL DAS RATAS WISTARS

O peso da ração (dieta) oferecida às ratas foi monitorado duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras) durante todo período de administração da dieta. Foi utilizada uma balança (marca Balmak) disponível no Biotério, sendo que um béquer de plástico foi colocado sobre a balança e a mesma foi tarada, para posterior pesagem da ração. A partir do primeiro dia de contato com o macho, o casal inicialmente recebeu 300g de ração conforme a dieta determinada: controle ou deficiente. Dois dias após a oferta da ração, foi pesada a sobra desta dieta e realizado o cálculo do consumo dos animais através da fórmula:

$$\frac{\text{Total de ração ofertada (300g)} - \text{Sobra da ração (g)}}{2} = \text{Consumo individual}$$

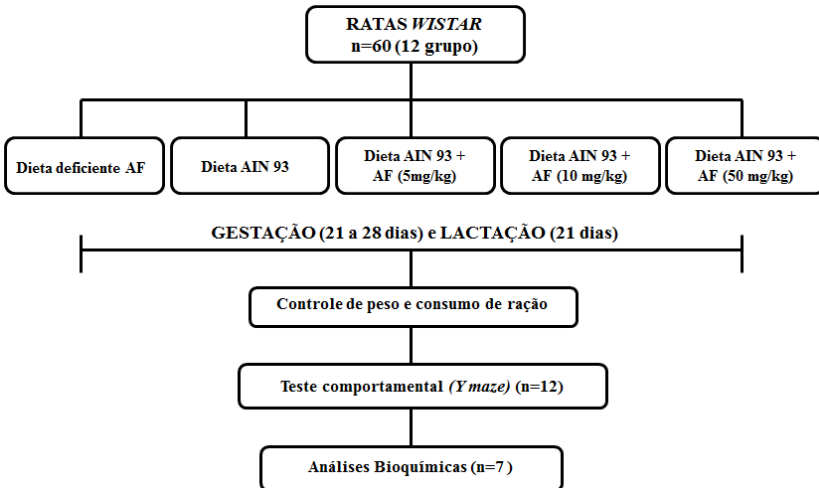
Ressalta-se que durante o acasalamento, foi calculada a média do consumo de ração, visto que os animais estavam em dois na mesma caixa e consumiram a mesma dieta. Após o acasalamento, as ratas permaneceram isoladas, uma por caixa, recebendo a quantidade suficiente para completar os 300g de ração especial, duas vezes por semana, e a sobra da dieta foi pesada nestes dias, para posterior cálculo do consumo de cada rata, através da fórmula:

$$\text{Total de ração ofertada (300g)} - \text{Sobra da ração (g)} = \text{Consumo rata}$$

O peso das fêmeas também foi monitorado semanalmente (sextas-feiras) durante todo período gestacional. Utilizou-se a mesma balança e béquer usado na pesagem de ração para realização da pesagem individual das fêmeas. O controle de peso gestacional das ratas é um parâmetro importante para o acompanhamento do peso conforme a dieta oferecida neste período.

Ainda foi realizada a contagem do número total de filhotes ao nascer de cada gestante conforme sua dieta previamente determinada. Salienta-se que após o nascimento da prole, todos os filhotes (machos e fêmeas) permaneceram junto à mãe para a amamentação por 21 dias e as mães continuaram recebendo à mesma dieta oferecida na gestação até o final da lactação. Logo após o desmame, a prole foi submetida à sexagem e o número de filhotes machos e fêmeas também foi levado em consideração para este estudo, de acordo com a dieta materna. A prole destas ratas *Wistar* foi destinada para outro estudo.

Após o último dia de amamentação, as ratas mães foram submetidas ao teste comportamental labirinto em Y (Y maze). Imediatamente após esse teste, as ratas foram mortas por decapitação sem anestesia, o sangue coletado para posteriores análises dos níveis de homocisteína e análise do perfil lipídico e as estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dissecadas para análise do dano oxidativo (**Figura 3**).



**Figura 3:** Desenho experimental. Ratas *Wistar* foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos (n= 12) e receberam dois tipos de dieta (ração) especial - dieta AIN 93 (dieta controle) e dieta deficiente em ácido fólico - durante todo período gestacional (21 a 28 dias) e lactacional (21 dias). As fêmeas que receberam a dieta AIN 93 ainda foram subdivididas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com ácido fólico nas doses de 5, 10 e 50mg/kg (v.o.), totalizando os cinco grupos experimentais maternos. O peso gestacional, o consumo de ração das ratas, bem como o número de filhotes foi considerado. Após a fase de amamentação, as ratas mães foram mortas por decapitação e o sangue imediatamente coletado para posterior análise dos níveis de ácido fólico e homocisteína. Fonte: Dados da pesquisadora, 2015.

### 3.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

#### 3.5.1 Labirinto em Y (Y maze)

O teste comportamental labirinto em *Y* (*Y maze*) foi realizado com as ratas mães imediatamente após o desmame da prole (22° dia após o parto). Este teste avalia a memória espacial. O aparelho apresenta três braços ou ambientes iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120°. O mesmo foi colocado em uma sala com dicas visuais nas paredes dos braços para facilitar a localização espacial dos animais. O teste foi realizado sempre em sala escura com iluminação de lâmpada vermelha. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços, chamado de “braço de partida ou *start*”, e teve livre acesso para explorar o outro “braço ou ambiente *other*” durante 5 minutos. O tempo de exploração em cada braço foi cronometrado. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto foi bloqueado por uma porta guilhotina e chamado de “braço novo ou *novel*”. O rato foi então removido do labirinto e retornou a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no “braço de partida ou *start*” do labirinto para explorar livremente todos os três braços durante 5 minutos. O número de entradas e o tempo de permanência em cada braço foram cronometrados. Os resultados foram expressos pelo percentual de entradas e de tempo de permanência no braço *novel* (Dellu et al., 1997).

### 3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises dos níveis de homocisteína foram realizadas pelo Laboratório Labvet Sul em Criciúma, SC. As técnicas do perfil lipídico, peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação de proteínas foram realizadas no Laboratório de Neurociências (Neurolab).

#### 3.6.1 Preparo das amostras

##### 3.6.1.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada imediatamente após a morte dos animais. Coletaram-se 3ml de sangue em tubos contendo ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 6 minutos e, o plasma, aliquoteado em *vials*

de 1ml e acondicionado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a determinação dos níveis de homocisteína.

### *3.6.1.2 Preparo das amostras cerebrais*

Após a decapitação dos animais em guilhotina, os cérebros foram removidos e dissecados em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. As amostras foram dissecadas em uma superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas. As amostras cerebrais foram devidamente preparadas de acordo com a técnica bioquímica a ser realizada.

### **3.6.2 Níveis plasmáticos de homocisteína**

Os níveis de homocisteína foram realizados por um Laboratório terceirizado (Labvet Sul) de Criciúma, SC.

### **3.6.3 Perfil lipídico**

Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos foram determinados através de kits comerciais ELISA, conforme as recomendações do fabricante.

### **3.6.4 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo**

#### *3.6.4.1 Peroxidação lipídica*

Para determinar o dano lipídico foi medida a formação de TBARS durante uma reação em meio ácido aquecido, conforme descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% e, em seguida, aquecidas em banho de água fervente por 30 minutos. Determinou-se os equivalentes de malondialdeído (nmol/mg de proteína) por espectrofotometria, à absorvância a 535 nm.

#### *3.6.4.2 Carbonilação de proteínas*

Avaliou-se o dano às proteínas pela determinação do teor de grupos carbonila baseado na reação com dinitrofenilidrazina (DNPH), conforme descrito por Levine et al. (1990). As proteínas foram

precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 20%, centrifugadas com força centrífuga de 8000g e então dissolvidas em DNPH. A absorbância foi monitorada por espectrofotometria a 370 nm.

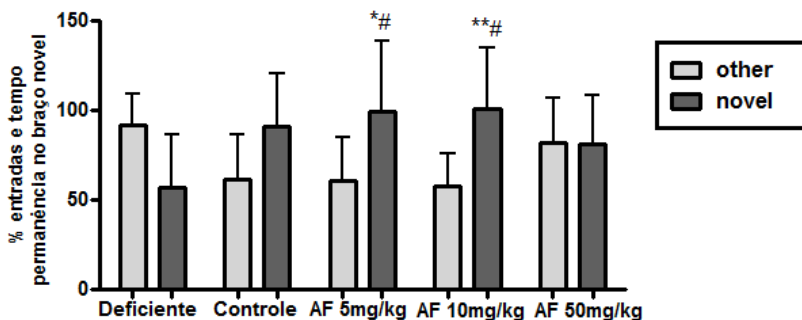
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O ganho de peso gestacional, o consumo de ração e o número de filhotes das ratas mães, assim como os resultados dos níveis de homocisteína, do perfil lipídico e do dano oxidativo foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguido por post hoc *Tukey* quando aplicável. O teste comportamental *Y maze* também foi avaliado por ANOVA de uma via e pelo teste *T student*. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) ou erro padrão da média (EPM).

Em todas as análises, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos estatisticamente. Foi utilizado para a realização das análises estatísticas o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS versão 17.0). Todos os gráficos foram elaborados no programa *Grahpad Prism*.

#### 4. RESULTADOS

Na Figura 4 são demonstrados os resultados do labirinto em Y (*Y maze*). As ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico apresentaram um déficit considerável na memória espacial, uma vez que exploraram menos o braço (ambiente) *novel* comparado ao *other*. As ratas do grupo controle permaneceram mais tempo no braço *novel* em relação ao *other*, porém não houve diferença significativa, o que indica um déficit de memória. Já as ratas suplementadas com ácido fólico (50 mg/kg) permaneceram o mesmo tempo no ambiente *other* e *novel*, portanto, não houve diferença estatística. Em contrapartida, as ratas suplementadas com ácido fólico (5 e 10mg/kg), respectivamente, exploraram mais o ambiente *novel* ( $p < 0,05$  e  $p \leq 0,01$ ) quando comparado ao ambiente *other*, indicando que não houve déficit na memória espacial. Além disso, as ratas suplementadas com ácido fólico (5 e 10mg/kg) também apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao ambiente *novel* do grupo deficiente.



**Figura 4:** Desempenho de ratas *Wistar* submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e dietas controle suplementadas com diferentes doses de ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e amamentação no teste labirinto em Y (*Y maze*). N=12. Os dados estão expostos como média  $\pm$  DPM. \* $p < 0,05$  comparado ao ambiente *other* do respectivo grupo; \*\*  $p \leq 0,01$  comparado ao ambiente *other* do respectivo grupo; #  $p < 0,05$  comparado com o ambiente *novel* do grupo deficiente.

A Tabela 2 representa o acompanhamento do peso semanal das ratas *Wistar* durante o acasalamento (1<sup>o</sup> semana), durante a fase gestacional (2<sup>o</sup> a 4<sup>o</sup> semana) e na fase de lactação (5<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup> semana). Observou-se que durante o acasalamento e a gestação, da 1<sup>o</sup> a 4<sup>o</sup> semana, não houve diferença significativa no ganho de peso das ratas submetidas às dietas. Na 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> semana, nenhuma diferença considerável no peso das ratas foi verificada durante a lactação. Porém, na última semana de amamentação (7<sup>o</sup> semana), as ratas do grupo controle e as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) apresentaram um peso superior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo deficiente.

	Deficiente	AIN93 controle	AIN93 AF 5mg/kg	AIN93 AF10mg/kg	AIN93 AF50mg/kg
1ª semana	223,38 ± 33,55	229,80 ± 25,13	223,08 ± 27,31	220,83 ± 17,98	229,07 ± 18,60
2ª semana	255,61 ± 15,39	256,40 ± 11,34	259,00 ± 15,62	249,33 ± 16,24	256,15 ± 18,79
3ª semana	268,53 ± 13,73	266,90 ± 13,11	276,25 ± 18,00	265,25 ± 17,20	266,69 ± 18,40
4ª semana	290,69 ± 16,86	295,50 ± 17,16	297,66 ± 24,64	300,25 ± 24,43	299,61 ± 22,18
5ª semana	308,76 ± 43,58	324,40 ± 32,52	310,33 ± 43,03	280,75 ± 22,25	295,69 ± 31,40
6ª semana	277,53 ± 19,48	290,80 ± 19,90	292,25 ± 24,68	295,75 ± 25,06	296,15 ± 20,92
7ª semana	263,50 ± 26,70	293,70# ± 13,07	302,20# ± 12,77	292,70# ± 19,94	299,81# ± 20,11

**Tabela 2:** Controle de peso das ratas mães durante o período de acasalamento, gestação e amamentação conforme as dietas administradas. Primeira semana representa a fase de acasalamento. Da 2ª a 4ª semana, as ratas estavam grávidas e entre a 5ª e 7ª semana estavam no período de amamentação. N=12. Os dados estão expostos como média ± DPM. # p <0,05 comparado ao grupo deficiente da respectiva semana.

Na Tabela 3 é apresentado o consumo individual (macho e fêmea) de ração durante o acasalamento (31/07), bem como o consumo individual das ratas durante a gestação (pesagem dias 04, 07, 11, 14, 18, 21/08) e na fase de lactação (dias 25 e 28/08 e dias 01, 04 e 08/09). Na semana do acasalamento dos animais, que iniciou dia 28/07, foi feita a média do consumo individual de ração, pois os ratos estavam em dois na mesma caixa. Pode-se observar que as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (10 e 50mg/kg) apresentaram um aumento significativo no consumo de ração durante o acasalamento ( $p < 0,05$ ), bem como no início do período gestacional (04 e 07/08) ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo deficiente em ácido fólico e o grupo controle. No dia 18/08, as ratas do grupo controle apresentaram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no consumo de comida em relação ao grupo deficiente. Os achados também mostraram que praticamente durante toda a amamentação (dias 25 e 28/08, 01 e 04/09), as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (10mg/kg) tiveram um consumo aumentado de ração ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao grupo deficiente em ácido fólico. Do mesmo modo, as ratas do grupo controle e submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (5 e 50mg/kg) demonstraram um aumento significativo no consumo de ração ( $p < 0,05$ ), porém apenas nos dias 01 e 04/09, em relação ao grupo deficiente em ácido fólico.

**Tabela 3:** Peso de ração (g) consumida pelas ratas mães durante o acasalamento, gestação e amamentação.

Data pesagem	Deficiente		AIN93 controle		AIN93 AF 5mg/kg		AIN93 AF 10mg/kg		AIN93 AF 50mg/kg	
31/07	69,26	± 7,13	65,85	± 5,91	66,54	± 7,39	126,33*#	± 15,02	130,54*#	± 20,68
04/08	86,88	± 8,10	87,90	± 8,08	91,62	± 8,70	120,83*#	± 16,57	115,31*#	± 18,70
07/08	59,30	± 11,33	59,80	± 9,53	63,91	± 8,93	89,58*#	± 8,28	92,34*#	± 9,35
11/08	70,38	± 18,27	70,80	± 10,52	65,75	± 8,06	70,16	± 7,94	70,61	± 6,99
14/08	60,69	± 10,97	71,80	± 17,64	64,66	± 9,15	66,66	± 5,85	65,46	± 10,24
18/08	75,30	± 13,29	89,90#	± 9,02	79,75	± 11,04	84,91	± 8,19	83,00	± 10,46
21/08	57,69	± 16,58	74,00	± 12,40	59,66	± 11,17	65,00	± 15,64	61,07	± 13,30
25/08	84,38	± 15,72	88,40	± 22,87	92,58	± 31,13	114,66#	± 31,76	96,53	± 25,12
28/08	90,46	± 22,24	107,30	± 32,29	110,83	± 37,43	130,75#	± 18,60	116,61	± 34,23
01/09	120,69	± 48,46	179,90#	± 37,88	174,3#	± 58,12	200,08#	± 17,54	176,84#	± 51,63
04/09	93,84	± 33,30	145,40#	± 18,52	143,25#	± 49,54	163,91#	± 14,31	145,76#	± 40,38
08/09	200,84	± 60,40	223,60	± 36,78	243,16	± 39,99	237,50	± 18,69	242,69	± 31,66

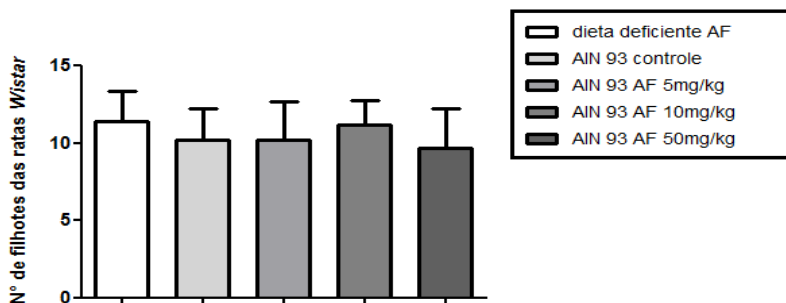
**Tabela 3:** Peso da ração consumida pelas ratas mães durante o período de acasalamento, gestação e amamentação.

As ratas deram a luz aos filhotes entre os dias 19/08 à 25/08 e após esse período, iniciou-se a amamentação por 21 dias. N=12.

Os dados estão expostos como média ± DPM. \* p <0,05 comparado ao grupo controle do respectivo dia e # p <0,05

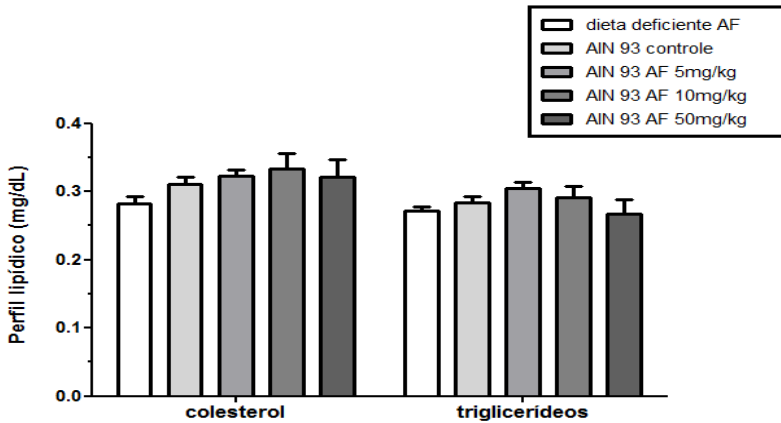
comparado ao grupo deficiente do respectivo dia.

A Figura 5 representa a média de filhotes nascidos vivos das ratas submetidas às diferentes dietas durante o acasalamento, gestação e lactação. Verifica-se que não houve diferença significativa no número de filhotes nascidos vivos entre as ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg).



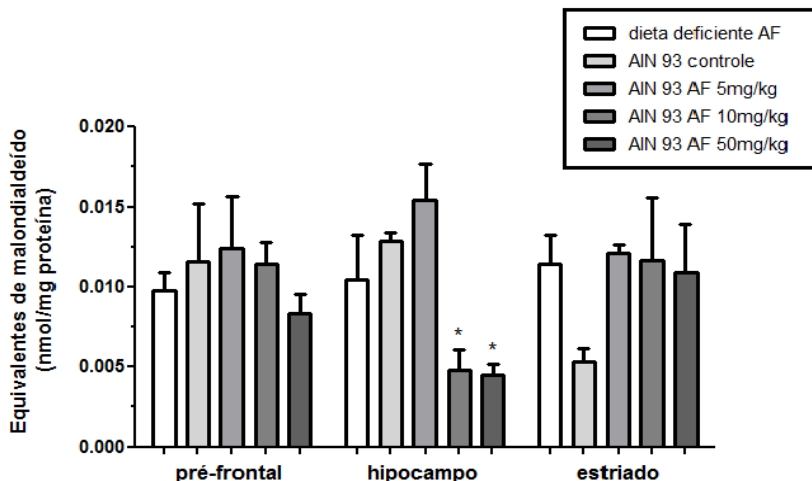
**Figura 5:** Número de filhotes nascidos vivos das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e lactação. N=12. Os dados estão expostos como média ± DPM.

Em relação ao perfil lipídico (Figura 6), nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg).



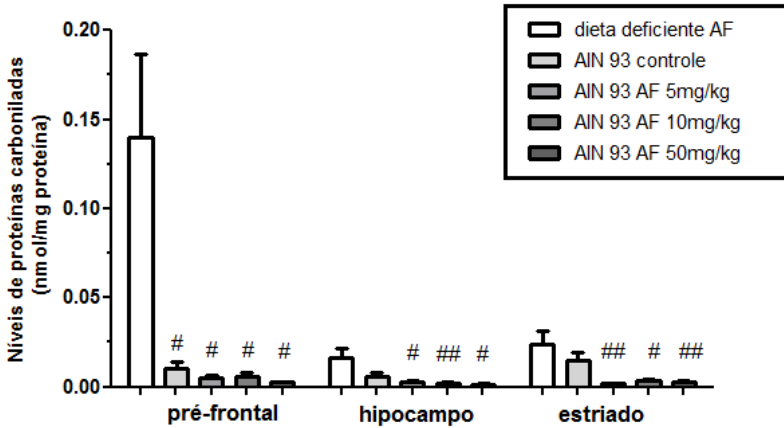
**Figura 6:** Níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, gestação e lactação. N=7. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM.

A Figura 7 apresenta os resultados referentes à peroxidação lipídica. Observou-se uma diminuição significativa nos níveis de TBARS apenas no hipocampo de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico 10mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 50mg/kg ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. Nas demais estruturas cerebrais nenhum efeito das dietas foi verificado. No estriado, os níveis de TBARS parecem ter diminuído nas ratas do grupo controle, no entanto, não houve diferença significativa deste grupo em relação aos demais grupos nesta estrutura cerebral.



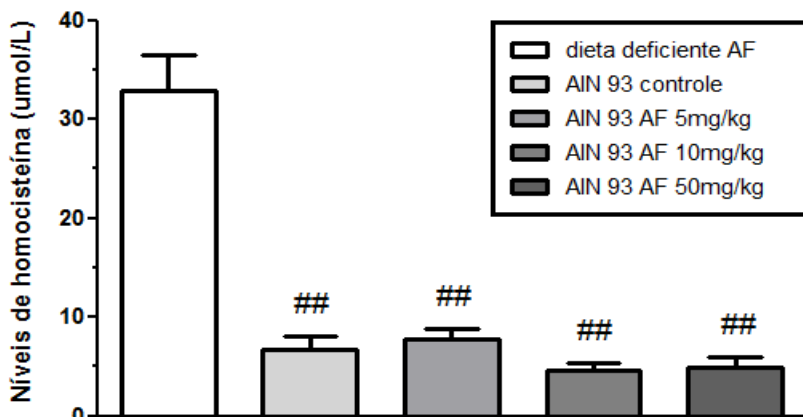
**Figura 7:** Níveis de equivalentes de malondialdeído nas estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, de ratas *Wistar* submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação. N=7. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* p <0,05 comparado ao grupo controle.

Para o dano proteico (Figura 8), verificou-se no córtex pré-frontal, uma diferença significativa nos níveis de carbonilação de proteínas nas ratas submetidas a dieta controle ( $p < 0,05$ ) e as dietas suplementadas com ácido fólico 5mg/kg ( $p < 0,05$ ), 10mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 50mg/kg ( $p < 0,05$ ) comparados a dieta deficiente. No hipocampo e estriado, respectivamente, as ratas suplementadas com ácido fólico 5mg/kg ( $p < 0,05$  e  $p \leq 0,01$ ), 10mg/kg ( $p \leq 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e 50mg/kg ( $p < 0,05$  e  $p \leq 0,01$ ) também apresentaram uma diminuição significativa no dano proteico em relação às ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico.



**Figura 8:** Níveis proteínas carboniladas nas estruturas cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, de ratas *Wistar* submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação. N=7. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo deficiente; ###  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo deficiente.

A análise plasmática de homocisteína, de acordo com a Figura 9, indicou um aumento significativo deste aminoácido nas ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico e, por sua vez, uma redução considerável nos níveis de homocisteína nas ratas submetidas a dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) ( $p \leq 0,01$ ) quando comparados à dieta deficiente.



**Figura 9:** Níveis plasmáticos de homocisteína de ratas *Wistar* submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas controle suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) durante o acasalamento, a fase gestacional e lactação. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. ##  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo deficiente.

## 5. DISCUSSÃO

A gestação e lactação são fases caracterizadas por variações hormonais, alterações cognitivas e de humor que estão diretamente relacionadas ao próprio estresse gerado pela gestação e ao processo de adaptação da mãe para o parto, o aleitamento, os cuidados maternos e a relação mãe-filho. Por estes motivos, a fase gestacional pode levar a consequências duradouras para o cérebro, comportamento, humor e cognição materna (Workman et al., 2012), inclusive, comprometendo a capacidade da mãe de cuidar da criança nos primeiros dias de vida (Prado et al., 2012).

Neste sentido, melhorias nos processos cognitivos durante a gravidez parecem essenciais, visto que este é um importante período para a mulher, bem como para a aquisição de conhecimentos e habilidades necessárias após a gestação (DeGroot et al., 2006). Sabe-se, portanto, que intervenções com micronutrientes, em especial vitaminas do complexo B, melhoram a cognição e o humor materno, salvo que estes nutrientes são essenciais para o adequado funcionamento do SNC (Prado et al., 2012).

Achados desta pesquisa demonstraram através do teste *Y maze*, realizado com as ratas mães imediatamente após o desmame da prole, que as ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico apresentaram um déficit considerável na memória espacial, uma vez que exploraram menos o ambiente *novel* em relação ao *other*. Estes resultados reforçam a ideia de que o ácido fólico é primordial para a manutenção das funções fisiológicas no cérebro adulto (Clarke et al., 2003). É sabido que a deficiência de folato em ratos tem demonstrado afetar a proliferação celular, o transporte vesicular e a plasticidade sináptica com efeitos a longo prazo no aprendizado e na memória (Daval et al., 2009). Esta deficiência pode ou não gerar anormalidades morfológicas severas sendo capaz, inclusive, de interferir no desenvolvimento cerebral (Berrocal et al., 2014).

As ratas suplementadas com ácido fólico (5 e 10mg/kg) foram capazes de explorar mais o ambiente *novel*, indicando que não apresentaram déficit na memória espacial. Por outro lado, estudo realizado por Akchiche e colaboradores (2012), mostrou que animais jovens suplementados com ácido fólico (40 mg/kg) durante 45 dias exibiram um déficit na memória espacial devido à capacidade diminuída de exploração do ambiente *novel*, além de um déficit no período de latência no teste comportamental labirinto aquático. Os resultados de Akchiche assemelham-se, pelo menos em parte, ao encontrado no

presente estudo, onde as ratas suplementadas com ácido fólico (50mg/kg) permaneceram praticamente o mesmo tempo em ambos os braços (*other* e *novel*). Tomados em conjunto, esses achados sugerem que doses mais altas de ácido fólico podem apresentar efeito tóxico, ao menos na função cognitiva, e ainda apontam que doses relativamente baixas deste micronutriente parecem apresentar o melhor efeito protetor.

Dados da literatura descrevem que a síntese de catecolaminas depende de vitaminas do complexo B, com destaque para o ácido fólico (Rosenberg, 2001; Beard e Connor, 2003; Mackey et al., 2006). Assim, a atividade da dopamina nos lobos frontais e gânglios basais desempenha ação na memória de trabalho (armazenamento temporário e manipulação de informações), na atenção e na função executiva (controle e gestão de processos cognitivos), além do controle motor (Nieoullon, 2002). A noradrenalina também é fundamental para a atenção, e tanto, a noradrenalina como a serotonina estão implicados no humor (Stahl, 2000). De fato, o presente estudo comprova que a dieta deficiente em ácido fólico impactou diretamente na cognição dos animais durante a fase gestacional, confirmando que esse nutriente pode afetar as funções cognitivas, particularmente a memória espacial.

O comprometimento cognitivo encontrado nas ratas submetidas à dieta deficiente neste estudo, também pode estar relacionado a modificações na capacidade de resposta ao estresse e às mudanças no perfil hormonal das ratas, uma vez que tudo isso está intrinsecamente associado à plasticidade hipocampal e ao fato dessa região desempenhar um importante papel na regulação do estresse, sendo ainda sensível aos hormônios esteróides, inclusive, mediando o desempenho da memória espacial (Galea et al., 2013). Estudo confirmou que ambos os fatores psicossociais e biológicos, incluindo fatores nutricionais, podem contribuir para o aumento da prevalência de depressão durante a gravidez ou após o parto, uma vez que nestas fases há um aumento na atividade do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) (O'Keane e Marsh, 2007). Ainda, pesquisa clínica indicou que os déficits de memória podem ser atribuídos à depressão, visto que mulheres grávidas relataram sintomas negativos (avolia, anedonia, isolamento social, aloxia) ou mudanças de memória neste período (Landro et al., 2001).

É importante salientar que neste estudo não se optou pela ração comum do Biotério como dieta controle, pelo fato da ração AIN 93 ser indicada em experimentos que utilizem ratas na fase gestacional e lactacional e ainda por outros três motivos importantes. Primeiramente, a ração comum do Biotério, é preparada com ingredientes integrais como o milho em grão que contém frações de amido, óleo de milho,

além de proteína, vitaminas e minerais misturados no mesmo grão e, assim, ocorre com os demais ingredientes da ração. Desta forma, torna-se difícil elaborar uma dieta livre de ácido fólico a partir da ração comum, visto que essa vitamina além de adicionada na ração pode estar presente nos demais ingredientes utilizados (grãos integrais) em maior ou menor concentração, dificultando ainda mais a eliminação total do ácido fólico para obter-se a ração deficiente nesta vitamina. Como neste estudo, utilizou-se a ração deficiente em ácido fólico, a mesma não poderia ser obtida a partir da dieta comum do Biotério. Em segundo lugar, o fato da ração comum não ser purificada, apresentando um padrão nutricional diferente, inclusive em relação à fonte proteica que é de origem vegetal quando comparada a proteína da ração AIN 93 que é de origem animal, fatores importantes que podem comprometer o aporte nutricional das ratas na fase de gestação e lactação. E, por último, o fato da dieta deficiente em ácido fólico ser elaborada a partir da ração AIN 93 a qual contém ingredientes purificados, garantindo assim, que o estudo seja mais fidedigno.

Tomados em conjunto, esses fatores justificam o uso da ração AIN 93 neste estudo, a qual foi indicada pelo responsável da empresa Pragsoluções. Como essa dieta é preparada apenas com ingredientes purificados, é possível identificar exatamente quais são os componentes de cada fração de macronutrientes (carboidratos, lipídios e as proteínas), além das vitaminas e minerais. Já a ração deficiente em ácido fólico é preparada a partir da ração AIN 93, contendo os mesmos ingredientes purificados, porém o mix de vitaminas é isento desta vitamina, reduzindo assim, o risco de um vies para o estudo.

Em relação ao acompanhamento do peso foi verificado que apenas na última semana de amamentação (7<sup>o</sup> semana), as ratas do grupo controle e as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) apresentaram um peso superior quando comparadas às ratas do grupo deficiente. Quanto ao consumo de ração pode-se observar que as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (10 e 50mg/kg) apresentaram um aumento significativo no consumo de ração durante o acasalamento, bem como no início do período gestacional (04 e 07/08) quando comparados ao grupo deficiente em ácido fólico e o grupo controle. No dia 18/08, as ratas do grupo controle apresentaram um consumo de ração maior que o grupo deficiente. Ainda, praticamente durante toda a amamentação (dias 25 e 28/08, 01 e 04/09), as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (10mg/kg) tiveram um consumo aumentado de ração quando comparadas ao grupo deficiente em ácido fólico. Do mesmo modo, as

ratas do grupo controle e as ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (5 e 50mg/kg) demonstraram um aumento significativo no consumo de ração, porém apenas nos dias 01 e 04/09, em relação ao grupo deficiente em ácido fólico. Esses resultados do consumo de ração podem estar relacionados, ao menos parte, ao fato das ratas controle e suplementadas com diferentes doses de ácido fólico terem recebido a mesma ração (dieta AIN 93), o que pode ter levado a um consumo alimentar semelhante pelas ratas.

Singh e colegas (2013) afirmam que o ganho de peso materno durante a gravidez deve-se a três fatores principais, incluindo o desenvolvimento fetoplacentário, a deposição de gordura materna e a expansão no volume de líquido extracelular materno (VLEC). Sabe-se que as ratas do grupo controle e suplementadas com diferentes doses de ácido fólico receberam o mesmo tipo de ração AIN 93 (dieta controle). A diferença entre esses grupos foi que as ratas suplementadas, além da ração, receberam ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg). Talvez neste estudo, isso explique ao menos em parte, o fato das ratas do grupo controle e suplementadas com ácido fólico, independentemente da dose, terem apresentado um peso superior às ratas do grupo deficiente na última semana de amamentação, bem como um consumo maior de ração durante todo o acasalamento, gestação e lactação em relação às ratas submetidas à dieta deficiente, cuja ração era isenta de ácido fólico. Sendo assim, o fato das ratas receberem a mesma ração pode ter colaborado para este achado e, em contrapartida, a deficiência de ácido fólico pode ter comprometido o ganho de peso e o consumo de ração das ratas deste estudo.

De modo geral, o menor número de filhotes poderia estar relacionado à menor exigência circulatória durante a gravidez associada a uma menor demanda energética durante a lactação e, portanto, a menor necessidade de expansão no VLEC e acúmulo de gordura materna, levando ao nascimento de menos filhotes. Por outro lado, um número maior de fetos poderia sinalizar uma maior resposta circulatória durante a gestação, bem como uma demanda de energia aumentada, resultando, conseqüentemente, numa maior necessidade de expansão no VLEC e gordura corporal materna (Singh et al., 2013). Salienta-se que na presente pesquisa nenhuma diferença significativa na média de filhotes nascidos vivos foi observada entre as ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas em ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg). Desse modo, as dietas utilizadas (deficiente e AIN 93), bem como a suplementação de diferentes doses

de ácido fólico, não influenciaram no número de filhotes nascidos das ratas mães neste estudo.

Sabe-se que as vitaminas do complexo B podem exercer efeito neuroprotetor modulando o estresse oxidativo cerebral induzido pela homocisteína (Boldyrev e Jonhson, 2007). O estresse oxidativo pode estar presente em qualquer momento da vida, inclusive em períodos mais críticos, como na fase gestacional. A deficiência de ácido fólico e vitamina B12 desencadeia o aumento nos níveis de homocisteína levando a produção de ER e, assim, ao estresse oxidativo materno (Roy et al., 2012).

Neste estudo, nenhuma alteração significativa foi observada no perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) das ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico, dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg). Está bem descrito que o ácido fólico participa de reações de metilação, inclusive na síntese de fosfolipídeos de membrana (Larsson et al., 2006). Porém neste estudo, o motivo pelo qual a dieta deficiente ou a suplementação de ácido fólico não alterou os níveis de colesterol e triglicerídeos, permanece desconhecido. Já os resultados referentes à peroxidação lipídica mostraram uma diminuição significativa nos níveis de TBARS apenas no hipocampo de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico (10 e 50mg/kg) quando comparado ao grupo controle. Nas demais estruturas cerebrais nenhum efeito das dietas foi verificado. Esses achados estão em concordância com estudos que comprovam a importância do ácido fólico na prevenção do estresse oxidativo, sendo um fator determinante para o metabolismo de um carbono materno e para a manutenção dos níveis de homocisteína, além de permitir a síntese de neurotransmissores, fosfolipídeos e metilação do DNA (Larsson et al., 2006; D'Souza et al., 2013). Neste contexto, o uso da terapia antioxidante para combater o estresse oxidativo durante a gravidez, é uma estratégia fundamental, pois estes compostos são capazes, não somente de modular o ciclo de um carbono e reduzir a homocisteína, mas ainda prevenir outros riscos gestacionais maternos (D'Souza et al., 2013).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado derivado principalmente da desmetilação da metionina. Diversos fatores, em especial deficiências de vitamina B, interferem no metabolismo da homocisteína podendo elevar os seus níveis e, portanto, desencadear efeitos neurotóxicos (Huang et al., 2001; Hague, 2003). Durante a gravidez, a hiperhomocisteinemia tem sido associada ao estresse oxidativo materno e às complicações gestacionais (Hague, 2003).

Estudos têm demonstrado também que a homocisteína induz estresse oxidativo em diferentes células por inibir a atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, superóxido dismutase) (Streck et al., 2003; 2004) e diminuir os níveis teciduais de vitaminas protetoras (A, B, C e E) (Henning et al., 1997). Em adição, a homocisteína age como agonista glutamatérgico, ativando receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios e gerando ER. O estresse oxidativo também pode ocorrer pela autooxidação da homocisteína e de outros dissulfetos liberando RL (Boldyrev e Jonhson, 2007).

Os prejuízos diretos nas proteínas ou na modificação química dos aminoácidos devido o estresse oxidativo e a glico-oxidação proteica pode dar origem a proteínas carboniladas, as quais são importantes biomarcadores para o dano oxidativo em geral. A presença de grupos carbonila como evidência de proteínas oxidadas, estabeleceu uma forte correlação entre a oxidação de proteínas, o estresse oxidativo e doenças diversas (Berlett e Stadtman, 1997).

Neste estudo, de modo geral, verificou-se uma diferença significativa nos níveis de proteínas carboniladas nas ratas submetidas à dieta controle e às dietas suplementadas com ácido fólico (5, 10 e 50mg/kg) em todas as estruturas cerebrais avaliadas, quando comparado às ratas da dieta deficiente. Similarmente, uma redução considerável nos níveis de homocisteína foi observada nestas mesmas ratas em relação às ratas da dieta deficiente em ácido fólico, a qual aumentou significativamente os níveis de homocisteína. Dessa forma, nosso estudo mostrou uma correlação significativamente positiva entre homocisteína e carbonilação de proteínas, corroborando pesquisa realizada por Rajendiran e colaboradores (2015).

Os achados do estudo podem ser explicados pelo fato da homocisteína ser capaz de sulfurar proteínas, uma vez que os radicais sulfidríla apresentam afinidade proteica, o que pode gerar dano oxidativo (Rajendiran et al., 2015). Ademais, a homocisteína pode ser facilmente oxidada em situações de estresse oxidativo, como na gestação, via formação de ERO (Loscalzo, 1996). Além disso, o carbono adicional na cadeia lateral da homocisteína permite que este aminoácido exista na forma de tiolactona, a qual reage com resíduo de lisina para formar ligações isopeptídicas (Sibrian-Vazquez et al., 2010). Assim, a homocistamida torna as proteínas mais propensas à oxidação gerando proteínas carboniladas (Wang et al., 2010).

Embora a concentração plasmática de homocisteína elevada seja considerada um marcador sensível do estado de ácido fólico, Rajendiran e colegas (2015) detectaram em seu estudo que essa hipótese pode não

ser verdade no caso de mulheres grávidas. Isso, provavelmente, pelo fato das gestantes fazerem uso de suplementos de ácido fólico durante toda a gravidez. Rajendiran et al. (2015) verificaram que na ausência da dieta deficiente em ácido fólico na fase gestacional, a hiperhomocisteinemia pode ser consequência de estresse oxidativo, bem como do próprio estresse induzido por distúrbios do sono durante a gestação. De certa forma, os achados anteriores confirmam os resultados da presente pesquisa, uma vez que na presença de ácido fólico, os níveis de homocisteína mantiveram-se baixos, ao contrário da dieta deficiente, que induziu o aumento significativo deste aminoácido.

Adicionalmente, a hiperhomocisteinemia prejudica as funções cognitivas em ratos. O estresse oxidativo, as anormalidades na maturação do cérebro (McCallet al., 1996), apoptose e comprometimento da plasticidade neural (Streck et al, 2003; 2004) são efeitos da homocisteína associados à disfunção cognitiva (Smith et al., 2010). Assim, o comprometimento cognitivo devido à hiperhomocisteinemia tem sido demonstrado em alguns modelos animais e corroboram o atual estudo, visto que nesta pesquisa às ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico apresentaram tanto déficit na memória espacial, como níveis elevados de homocisteína.

Resumidamente, essa pesquisa atual mostrou que o ácido fólico foi capaz de prevenir o comprometimento de memória e reduzir os níveis de homocisteína em ratas na fase gestacional e lactacional. Estudo realizado por Koz e colegas (2012) está em conformidade com nosso estudo, pois verificaram que a homocisteína prejudicou significativamente a memória espacial em ratos e, o resveratrol, potente antioxidante, apresentou efeito neuroprotetor.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que as ratas submetidas à dieta deficiente em ácido fólico durante o acasalamento, a gestação e a lactação apresentaram um prejuízo significativo na memória espacial, bem como níveis elevados de proteínas carboniladas no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, além de um aumento considerável nos níveis plasmáticos de homocisteína. Já o ácido fólico (5 e 10mg/kg) foi capaz de prevenir o dano cognitivo nas ratas suplementadas, resultado que pode ser atribuído ao efeito antioxidante desta vitamina e a sua importante ação no metabolismo de um carbono, uma vez que esse micronutriente ainda preveniu o dano proteico e manteve baixos os níveis de homocisteína nas ratas submetidas às diferentes doses de ácido fólico.

Finalmente, torna-se relevante mencionar a importância de avaliar diferentes doses de suplementação de ácido fólico durante a gestação e lactação, não apenas para a prole, mas especialmente para a saúde materna. Tudo isso pelo fato desse nutriente apresentar considerável efeito protetor contra o dano oxidativo, prejuízos cognitivos, hiperhomocisteinemia e, ainda, ser capaz de prevenir processos comuns na fase gestacional e pós-gestacional como a capacidade da mãe de cuidar da criança nos primeiros dias de vida, influenciando tanto em parâmetros comportamentais como bioquímicos. Assim, nosso estudo destacou-se por investigar os resultados da dieta materna, oferecida durante toda a fase gestacional e lactacional, na própria saúde materna das ratas, visto que a maior parte das pesquisas relacionam os efeitos das dietas ou da suplementação de nutrientes durante a gestação geralmente com a saúde da prole.

## REFERÊNCIAS

Akchiche N, Bossenmeyer-Pourie C, Kerek R. Homocysteinylolation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J* 2012; 26:3980–92.

Aldred S, Griffiths HR. Oxidation of protein in human low-density lipoprotein exposed to peroxy radicals facilitates uptake by monocytes; protection by antioxidants in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004; 15(2-3):111-7.

Barua S, Kuizon S, Junaid MA. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease. *J. Biomed Sci* 2014; 21(1):77.

Baumgartner MR. Vitamin-responsive disorders: cobalamin, folate, biotin, vitamins B1 and E. *Handb Clin Neurol* 2013; 113:1799-1810.

Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annual Review of Nutrition* 2003; 23:41–58.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272(33):20313-16.

Berrocal ZIM, Sequeira MJ, Murphy M, Ballart FDJ, Baki AGS, Bergold JP, Quadros VE. Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits. *Br J Nutr* 2014; 112:1323-32.

Bharat S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, Andersen JK. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology* 2002; 23(4-5):479-86.

Boldyrev AA, Johnson P. Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11(2):219–28.

Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29(7):1103-12.

Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol* 2008a; 598(1-3):37-42.

Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* 2008b;54(2):464-73.

Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res* 2009; 200(1):122-7.

Bryan J. Cognitive function and its links with nutrition. *Proc Nutr Soc* 1998; 22:211-5.

Buckwalter JG, Buckwalter DK, Bluestein BW, Stanczyk FZ. Pregnancy and post partum: Changes in cognition and mood. *Prog Brain Res* 2001; 133:303-19.

Budni J, Romero Um, Molz S, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Del Barrio L, Tasca CI, Rodrigues AL, López MG. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience* 2011; 190:346-53.

Budni J. Investigação da ação antidepressiva e neuroprotetora do ácido fólico. 2012. 214 f. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

Calvaresi E, Bryan JB. Vitamins, cognition and ageing: a review. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 2001; 56(6):327-39.

Casper RC. Nutrients, neurodevelopment and mood. *Curr Psychiatry Rep* 2004; 6(6):425-29.

Christian P, Osrin D, Manandhar DS, Khatry SK, de LC AM, West KP Jr. Antenatal micronutrient supplements in Nepal. *Lancet* 2005; 366(9487):711-2.

Clarke R, Refsum H, Birks J, Grimley Evans J, Johnston C, Sherliker P. Screening for vitamin B12 and folate deficiency in older people. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(5):1241-7.

Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. 2. ed. São Paulo: Manole, 2006;385-99.

Crawley RA, Dennison K, Carter C. Cognition in pregnancy and the first year post-partum. *Psychol Psychother* 2003; 76(Pt 1):69-84.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2):389-406.

Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(1)E1.

DeGroot RHM, Vuurman EFPM, Hornstra G, Jolles J. Differences in cognitive performance during pregnancy and early motherhood. *Psychol Med* 2006; 36:1023-32.

Dellu, F, Fauchey, V, Le Moal, M, Simon, H. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 67:112-20.

Desantis DT, Schmaltz LW. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Dev Psychobiol* 1984; 17(3):255-62.

Djukic, A. Folate-responsive neurologic diseases. *Pediatric Neurol* 2007; 37(6):387-97.

Dogan M, Ozdemir O, Sal EA, Dogan SZ, Ozdemir P, Cesur Y, Caksen H. Psychotic disorder and extrapyramidal symptoms associated with vitamin B12 and folate deficiency. *J Trop Pediatr* 2009;55(3):205-7.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186: 421-31.

D'Souza V, Chavan-Gautam P, Joshi S. Counteracting oxidative stress in pregnancy through modulation of maternal micronutrients and omega-3 fatty acids. *Curr Med Chem*. 2013; 20(37):4777-83.

Evans J, Heron J, Francomb H, Oke S, Golding J. Cohort study of depressed mood during pregnancy and after childbirth. *BMJ* 2001; 323: 257-60.

Finglas PM, Wright AJ, Wolfe CA, Hart DJ, Wright DM, Dainty JR. Is there more to folates than neural-tube defects? *Proc Nutr Soc* 2003; 62:591-8.

Galea LA, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK. Sex, hormones, and neurogenesis in the hippocampus: Hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. *J Neuroendocrinol* 2013; 25:1039-61.

Gunawardana L, Smith GD, Zammit S , Whitley E , Gunnell D , Lewis S , Rasmussen F. Pre-conception inter-pregnancy interval and risk of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2011; 199:338-9.

Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17(3):459-69.

Haider BA, Bhutta ZA. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. 2012.

Haider BA, Yakoob MY, Bhutta ZA. Effect of multiple micronutrient supplementation during pregnancy on maternal and birth outcomes. *BMC Public Health* 2011;11(Suppl 3):S19.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. Oxford University Press 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford University Press 2006.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press 2007.

Hampson E, Phillips SD, Duff-Canning SJ, Evans KL, Merrill M, Pinsonneault JK, Sadée W, Soares CN, Steiner M. *Horm Behav* 2015; 74:218-27.

Hannan-Fletcher MP, Armstrong NC, Scott JM, Pentieva K, Bradbury I, Ward M, Strain JJ, Dunn AA, Molloy AM, Kerr MA, McNulty H. Determining bioavailability of food folate in a controlled intervention study. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:911-18.

Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate- deficient diets. *Free Radical Biol Med* 1997; 23:936-42.

Ho V, Massey TE, King WD. Effects of methionine synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on markers of one-carbon metabolism. *Genes Nutr* 2013; 8(6):571-80.

Huang RF, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001; 131:33-8.

Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol* 2004; 56(2):221-7.

Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* 2005; 15:1836-43.

Koz ST, Etem EO, Baydas G, Yuce H, Ozercan HI, Kuloğlu T, Koz S, Etem A, Demir N. Effects of resveratrol on blood homocysteine level, on homocysteine induced oxidative stress, apoptosis and cognitive dysfunctions in rats. *Brain Res* 2012;1484:29-38.

Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, Jay TM, Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol Med* 2009; 15(12):562-70.

Lamers Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14(5):445-54.

Landrø NI, Stiles TC, Sletvold H. Neuropsychological function in nonpsychotic unipolar major depression. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 2001; 14:233-240.

Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric and pancreatic cancer. A meta-analysis. *Gastroenterology* 2006; 131(4):1271-83.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-78.

Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98(1):5-7.

Mackey AD, Davis SR, Gregory JF. Vitamin B6. In: Shils M, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2006; 452-61.

Marchioni DM, Verly Jr E, Steluti J, Cesar CL, Fisberg RM. Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica* 2013; 29(10):2083-92.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 2003; 26(3):137-46.

McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, Zhang CL, Pearce RA, Chiu SY, Messing A. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93:6361-6.

McNulty H. Folate requirements for health in different population groups. *Brit. J Biomed Sci* 1995; 52(2):110-9.

Melo GJO. A importância do ácido fólico para o desenvolvimento embrionário e seu papel protetor de ocorrência de gestações afetadas pelos defeitos do tubo neural fetal. *Cadernos Interdisciplinares: Saúde Tecnologia e Questão Social*, 2004; 1(1):1-20.

Miller AL. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern Med Rev* 2008; 12(3):216-26.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry* 2009; 65(9):732-41.

Mischoulon D, Raab MF. The role of folate in depression and dementia. *J Clin Psychiatry* 2007; 68:28-33.

Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyssönen K, Salonen JT. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Rad Biol Med* 2004; 37(9):1351-9.

Nieoullon A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* 2002; 67:53-83.

O'Keane V, Marsh MS. Depression during pregnancy. *BMJ* 2007; 334: 1003-5.

Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46:214-23.

Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *J Nutr Biochem* 2013; 24(5):725-43.

Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res* 2012; 233(2):398-404.

Prado EL, Ullman MT, Muadz H, Alcock KJ, Shankar AH; SUMMIT Study Group. The effect of maternal multiple micronutrient supplementation on cognition and mood during pregnancy and postpartum in Indonesia: a randomized trial. *PLoS One* 2012;7(3):e32519.

Rajendiran S, Swetha Kumari A, Nimesh A, Soundararaghavan S, Ananthanarayanan PH, Dhiman P. Markers of Oxidative Stress in Pregnant Women with Sleep Disturbances. *Oman Med J* 2015; 30(4):264-9.

Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radic Antioxid* 2011; 1(4):2-7.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11):1939-51.

Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function. *Nutr Rev* 2001; 59: S69-73; discussion S73-64.

Roy S, Anvita K, Dangat K, Sable P, Asmita K, Joshi S. Maternal micronutrients (folic acid and vitamin B12) and omega 3 fatty acids: Implications for neurodevelopmental risk in the rat offspring. *Brain Dev* 2012; 34:64-71.

Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(2):155-65.

Selhub J, Bagley LC, Miller K, Rosebery IH. B vitamins, homocystein, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:6145-205.

Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samei GK, Strongin RM. Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(2):551-554.

Sifakis S, Pharmakides G. Anemia in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:125-36.

Singh HJ, Saleh HI, Gupalo S, Omar E. Effect of melatonin supplementation on pregnancy outcome in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Sheng Li Xue Bao* 2013;65(2):149-57.

Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, Oulhaj A, Bradley KM, Jacoby R, Refsum H. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2010; 5(9):e12244.

Stahl SM. *Essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications.* Cambridge: Cambridge University Press 2000.

Stahl SM. Novel therapeutics for depression: L-methylfolate as a trimonoamine modulator and antidepressant-augmenting agent. *CNS Spectr* 2007; 12(10):739-44.

Stamm RA, Houghton LA. Nutrient intake values for folate during pregnancy and lactation vary widely around the world. *Nutrients* 2013; 5:3920-47.

Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003; 18:147-54.

Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. *Behav Brain Res* 2004; 153:377-81.

Tolmunen T, Voutilainen S, Hintikka J, Rissanen T, Tanskanen A, Viinamäki H, Kaplan GA, Salonen JT. Folate and depressive symptoms are associated in middle-aged Finnish men. *Am Soc Nutr Sci* 2003; 133:3233-36.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189(1-2):41-54.

Van Abeelen AF, Elias SG, Bossuyt PM, Grobbee DE, Van Der Schouw VT, Roseboom TJ, Uiterwaal CS. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* 2012; 61(9):2255-60.

Wagner C. Biochemical role of folate. In: Bailey LB. *Cellular metabolism. Folate in Health and Disease.* New York: Marcel Dekker 1995; 23-42.

Wang L, Li J, Xie Y, Zhang XG. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Biomed Environ Sci* 2010; 23(1):42-7.

Workman JL, Barha CK, Galea LA. Endocrine substrates of cognitive and affective changes during pregnancy and postpartum. *Behav Neurosci* 2012; 126(1):54-72.

World Health Organisation. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Geneva: WHO 2004.

Yajnik CS, Deshmukh US. Fetal programming: maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. *REV Endocr Metab Disord* 2012; 13(2):121-7.

Zhao M, Chen YH, Chen X, Dong XT, Zhou J, Wang H, Wu SX, Zhang C, Xu DX. Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice. *Toxicol Lett* 2014; 224(2):201-8.

Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med* 1999; 26(1-2):202-26.

## ANEXO

Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

